

DE10040904

Patent number: DE10040904
Publication date: 2002-02-28
Inventor:
Applicant: BOEGER RAINER H (DE)
Classification:
- **international:** G01N33/68; G01N33/68; (IPC1-7): C07K16/00;
G01N33/53; G01N33/68
- **europaean:** G01N33/68A2D
Application number: DE20001040904 20000818
Priority number(s): DE20001040904 20000818

Report a data error here

Abstract of DE10040904

The invention relates to methods and agents for detecting the probability of the future occurrence or progression of diseases that are associated with a disorder of the NO metabolism.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



13 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 100 40 904 A 1**

51 Int. Cl. 7:
C 07 K 16/00
G 01 N 33/68
G 01 N 33/53

71 Aktenzeichen: 100 40 904.0
72 Anmeldetag: 18. 8. 2000
73 Offenlegungstag: 28. 2. 2002

DE 100 40 904 A 1

71 Anmelder:
Böger, Rainer H., Prof. Dr.med., 22083 Hamburg, DE
73 Vertreter:
Heldt, G., Dipl.-Ing. Dr.jur., Pat.- u. Rechtsanwalt,
20354 Hamburg

72 Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren und Mittel zum Nachweis einer Wahrscheinlichkeit zukünftigen Fortschreitens von Gefäßerkrankungen

57 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) sind natürlich vorkommende Analoge der Aminosäure L-Arginin. Ihre Konzentrationen in Plasma, Urin und anderen biologischen Matrices werden bislang mittels Hochdruck-Flüssigkeitsschromatographie (HPLC) bestimmt. Diese Verfahren sind durch hohen technischen, apparativen und zeitlichen Aufwand gekennzeichnet. Die Konzentration von ADMA im Plasma ist bei Patienten mit Herz-Kreislauf-erkrankungen erhöht. Ob jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen hohen ADMA-Konzentrationen und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen besteht, war bislang nicht bekannt. Das neue Verfahren soll den weniger aufwändigen und ubiquitär verwendbaren Nachweis von ADMA und SDMA in der klinisch-chemischen Routineanalytik ermöglichen und die Beurteilung des künftigen kardiovaskulären Risikos eines Patienten aufgrund der so gewonnenen Messergebnisse erlauben. Monoklonale bzw. polyklonale Antikörper gegen ADMA und SDMA werden durch Immunisierung von Versuchstieren, Zellfusion und Isolation geeigneter Zellklone in vitro gewonnen. Mit diesen Antikörpern werden immunchemische Nachweisverfahren hergestellt, die es erlauben, ADMA und SDMA selektiv in biologischen Flüssigkeiten sowie Gewebsschnitten und -extrakten nachzuweisen. Durch prospektive Ermittlung des Zusammenhangs zwischen ADMA-Konzentration und kardiovaskulärer Erkrankungshäufigkeit ist es ferner erstmals möglich, die ermittelten Konzentrationen für die klinische ...

BEST AVAILABLE COPY

DE 100 40 904 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis einer Wahrscheinlichkeit zukünftigen Fortschreitens von Gefässerkrankungen. Darüberhinaus betrifft die Erfindung Mittel zum Nachweis von endogenen Methyl-Argininen in biologischen Flüssigkeiten.

[0002] Die endogenen Methyl-Arginine ADMA und SDMA sind Derivate der Aminosäure L-Arginin. L-Arginin ist die Vorstufe zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im menschlichen Körper. NO wiederum ist ein wichtiger physiologischer Mediator im Herz-Kreislaufsystem, der an der Regulation von Blutdruck und Gefäßwiderstand, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, Adhäsion von Leukozyten und Monozyten und der Proliferation glatter Gefäßmuskulzellen beteiligt ist (Böger et al., *Atherosclerosis* 1996; 127: 1-11). Bei Herz-Kreislauferkrankungen wie Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertonie, chronischer Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus und anderen kommt es zur Abschwächung der biologischen Wirkungen von NO, wodurch das Fortschreiten dieser Erkrankungen und der begleitenden Gefäßläsionen beschleunigt wird. Durch Gabe von L-Arginin kann diesem Geschehen entgegengewirkt werden.

[0003] In mehreren klinischen und experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es bei den genannten Erkrankungen zu einem Ansteigen der Konzentration des endogenen L-Arginin-Analogons ADMA im Plasma oder Serum kommt. Erhöhte Konzentrationen von ADMA wurden gefunden bei peripherer arterieller Verschlusskrankung (Böger et al., *Circulation* 1997; 95: 2068-2074), bei Hypercholesterinämie (Böger et al., *Circulation* 1998; 98: 1842-1847), bei Hypertonie (Surdacki et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33: 652-658), bei chronischer Niereninsuffizienz (Kielstein et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10: 594-600) und bei chronischer Herzinsuffizienz. Eine Ursachen-Wirkungsbeziehung zwischen erhöhten ADMA-Konzentrationen und diesen Erkrankungen konnte aus den Ergebnissen dieser Studien jedoch nicht abgeleitet werden. ADMA ist ein Inhibitor der Bildung von NO aus L-Arginin, die durch das Enzym NO-Synthase in Endothelzellen vermittelt wird. Somit wäre erklärlich, dass die erhöhten Konzentrationen von ADMA durch Hemmung der NO-Bildung zum Fortschreiten des arteriosklerotischen Prozesses beitragen könnten. Dagegen ist SDMA zwar ebenfalls ein endogen vorkommendes Molekül, welches aber offenbar keine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der NO-Synthase ausübt.

[0004] Der Erfindung liegt die Beobachtung zugrunde, dass Patienten mit Hypercholesterinämie, peripherer Arteriosklerose, Herzinsuffizienz, chronischer Niereninsuffizienz und Hypertonie höhere Konzentrationen von ADMA im Plasma aufweisen als gesunde Probanden. Wir haben nunmehr erstmals zeigen können, dass ADMA ein für das zukünftige Fortschreiten der Gefässerkrankung prognostisch relevanter Faktor ist: Patienten mit höheren ADMA-Konzentrationen haben eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, eine bedrohliche Durchblutungsstörung zu erleiden oder daran zu versterben als Patienten mit niedrigeren ADMA-Konzentrationen (Beispiel 1). Patienten mit hohen ADMA-Konzentrationen haben auch insgesamt ein signifikant höheres Risiko zu versterben, unabhängig von der zugrundeliegenden Todesursache (Beispiel 2). Schliesslich findet sich bei Patienten mit höheren ADMA-Konzentrationen signifikant häufiger eine Verdickung der Arterienwand in der Halsschlagader (A. carotis) als bei Patienten mit niedrigen ADMA-Konzentrationen (Beispiel 3).

[0005] Da ADMA somit ein für den Krankheitsverlauf der

Herz-Kreislauferkrankung relevanter Faktor ist, ist es nützlich, die Konzentration beim individuellen Patienten mittels eines universell verfügbaren und raschen diagnostischen Tests spezifisch messen und sie von der SDMA-Konzentration unterscheiden zu können.

[0006] Die derzeit verfügbaren Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von ADMA und SDMA in Plasma, Serum, Urin und anderen biologischen Flüssigkeiten (Gewebs-extrakten, Zellkulturüberständen u. a.) basieren allesamt auf dem chemischen Nachweisverfahren der Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Verschiedene Modifikationen von HPLC-Methoden werden hierzu derzeit eingesetzt. Diese Methoden sind jedoch sehr Zeit- und personalintensiv, teuer, und somit für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet.

[0007] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Wahrscheinlichkeit des zukünftigen Fortschreitens von Gefässerkrankungen nachzuweisen.

[0008] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäss dadurch gelöst, dass ein Gehalt von endogenen Methyl-Argininen in biologischen Flüssigkeiten bestimmt wird.

[0009] Trotz der sehr umfangreichen Bestimmung verschiedenster bisher bekannter kardiovaskulärer Risikofaktoren ist bei einem Anteil von Patienten trotz Fehlens solcher bisher bekannter Risikofaktoren ein Fortschreiten von Gefässerkrankungen nachzuweisen. Die Erfindung weist den Vorteil auf, dass zumindest ein Teil dieser Fälle durch das Vorliegen erhöhter Konzentrationen der endogenen Methyl-Arginine erklärt werden kann und somit eine verbesserte Prognose über den Krankheitsverlauf abgegeben werden kann.

[0010] Die bisher eingesetzten Nachweisverfahren für ADMA und SDMA basieren auf dem Prinzip der HPLC, was sie sehr aufwändig und teuer macht, so dass diese Verfahren nicht umfassend in klinischen Alltag eingesetzt werden können, sondern spezialisierten Forschungslabors vorbehalten bleiben. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren vorzulegen, mit dessen Hilfe einfach, kostengünstig und universell klinisch nutzbar die endogenen Methyl-Arginine ADMA und SDMA quantitativ in biologischen Flüssigkeiten bestimmt werden können.

[0011] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäss dadurch gelöst, dass zur Bestimmung des Gehaltes von endogenen Methyl-Argininen in einer biologischen Flüssigkeit auf diese mit Antikörpern eingewirkt wird.

[0012] Die Bestimmung der ADMA- und SDMA-Konzentrationen mittels immunochemischer Verfahren (d. h. unter Verwendung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern) hat erfindungsgemäss wesentliche Vorteile:

1. Die Messung der ADMA- und SDMA-Konzentrationen mittels Verwendung antikörperbasierter Verfahren muss nicht in hochspezialisierten HPLC-Labors durchgeführt werden. Immunochemische Nachweisverfahren wie Radioimmunoassays, Enzymimmunoassays etc. sind in den meisten klinisch-chemischen Labors routinemässig verfügbar.
2. Die Messung mit immunochemischen Nachweisverfahren dauert weniger lange als die Messung mittels HPLC. Für letzteres Verfahren ist eine aufwendige Probenextraktion aus der jeweiligen Matrix (Plasma, Serum, Urin o. a.) erforderlich, damit die Messung per HPLC erfolgen kann. Das rasche Vorliegen des Messwertes ist aber für die Verwendung des ADMA- bzw. SDMA-Nachweises im klinischen Alltag unabwiesbar notwendig, damit dieser Parameter als Krankheits-Marker breite Akzeptanz finden kann.
3. Immunochemische Nachweisverfahren können ne-

den der klinischen Routine auch in experimentellen Anwendungen zum Einsatz kommen (z. B. Immunohistochemie, Immunozytochemie, Immunoblotting).

4. Entsprechend der vorliegenden Erfindung ist der diagnostische Nachweis von ADMA bzw. SDMA geeignet, um prospektiv über das kardiovaskuläre Risiko eines Patienten Aufschluss zu erlangen ("kardiovaskulärer Risikofaktor").

[0013] Die Erzeugung monoklonaler Antikörper erfolgt nach allgemein bekannten immunologischen Verfahren durch Fusion von immunkompetenten Zellen sensibilisierter Versuchstiere mit Myelomzellen und Selektion der die spezifischen Antikörper produzierenden Zellklone mittels Standardverfahren. Die Erzeugung polyklonaler Antikörper erfolgt mittels Gewinnung von Immuns serum von immunisierten Versuchstieren nach allgemein bekannten Verfahren. Die Produktion monoklonaler Antikörper gegen ADMA und SDMA umfasst die Kultivierung der Antikörper-produzierenden Zellklone, die Gewinnung des Antikörper enthaltenden konditionierten Mediums, sowie die Abfüllung und den Vertrieb der Antikörperlösungen. Die Nutzung der Antikörper umfasst ihren Einsatz zu diagnostischen und wissenschaftlichen Zwecken, als Antikörper-Suspension oder als Bestandteil eines diagnostischen Kits, in den Bereichen der klinischen Medizin, der experimentellen Medizin, der Veterinärmedizin, der Biologie und anderer Biowissenschaften.

[0014] Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1

[0015] 225 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurden in eine klinische Studie aufgenommen. Zu Beginn der Studie wurde jedem Patienten eine Blutprobe entnommen, in der die Konzentrationen von ADMA und SDMA sowie von L-Arginin bestimmt wurden. Die Patienten wurden über eine mittlere Beobachtungsdauer von 26 Monaten (1-35 Monaten) nachbeobachtet. Während dieser Zeit erlitten 57 Patienten ein kardiovaskuläres Krankheitsereignis (Myokardinfarkt, Schlaganfall, periphere Durchblutungsstörung oder kardial bedingter Tod). Patienten mit einem solchen kardiovaskulären Krankheitsereignis hatten zu Beginn der Studie signifikant höhere ADMA-Konzentrationen gehabt (Median 3,2 $\mu\text{mol/L}$) als Patienten ohne solches Ereignis (Median 2,2 $\mu\text{mol/L}$). ADMA erwies sich in der statistischen Analyse als ein unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Krankheitsereignisse. Wurden die Patienten anhand der zu Beginn der Studie gemessenen ADMA-Plasmakonzentrationen in Gruppen eingeteilt (ADMA < 50. Perzentile, 51.-70. Perzentile, 71.-90. Perzentile, und >90. Perzentile), so ergab sich eine klare Zunahme der Inzidenz kardiovaskulärer Todesfälle mit steigender ADMA-Konzentration (Abb. 1).

Beispiel 2

[0016] Bei 225 Patienten, bei denen in einer zu Beginn der Studie abgenommenen Blutprobe die ADMA-Konzentration bestimmt worden war, traten im Verlauf einer im Mittel 26 Monate dauernden Nachbeobachtungsphase insgesamt 57 Todesfälle aufgrund verschiedenster Ursachen auf. Patienten, die im Verlauf der Studie verstarben, hatten zu Beginn signifikant höhere ADMA-Konzentrationen aufgewiesen (Median 3,5 $\mu\text{mol/L}$) als Patienten, die überlebten (2,3 $\mu\text{mol/L}$). ADMA erwies sich als ein von anderen Risikofaktoren unabhängiger Prädiktor des Überlebens. Wurden die Patienten anhand der zu Beginn der Studie gemessenen

ADMA-Plasmakonzentrationen in Gruppen eingeteilt (ADMA < 50. Perzentile, 51.-70. Perzentile, 71.-90. Perzentile, und >90. Perzentile), so ergab sich eine klare Zunahme der Gesamtmortalität mit steigender ADMA-Konzentration (Abb. 2).

Beispiel 3

[0017] Bei 90 Patienten wurde in einer Plasmaprobe die ADMA-Konzentration bestimmt. Anschliessend wurde bei diesen Patienten mittels hochauflösender Ultraschalluntersuchung die Wanddicke der Halsschlagader (A. carotis) vermessen. ADMA war ein unabhängiger Einflussfaktor für die Intima/Media-Dicke der A. carotis (Abb. 3), für die lumenale Querschnittsfläche, und für den Schweregrad der atherosklerotischen Läsionen in der A. carotis.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Wahrscheinlichkeit zukünftigen Fortschreitens von Gefässerkrankungen, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Gehalt von endogenen Methyl-Argininen in einer biologischen Flüssigkeit nachgewiesen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass festgestellt wird, wie hoch in der biologischen Flüssigkeit eine Konzentration von ADMA ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass festgestellt wird, wie hoch in der biologischen Flüssigkeit eine Konzentration von SDMA ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung des Gehaltes von endogenen Methyl-Argininen in einer biologischen Flüssigkeit auf diese mit Antikörpern eingewirkt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass mit monoklonalen Antikörpern auf die das endogene Methyl-Arginin enthaltende biologische Flüssigkeit eingewirkt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass mit polyklonalen Antikörpern auf die das endogene Methyl-Arginin enthaltende biologische Flüssigkeit eingewirkt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die monoklonalen Antikörper durch Kultivierung der Antikörper-produzierenden Zellklone und Gewinnung einer die Antikörper enthaltenden Lösung gewonnen werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die polyklonalen Antikörper durch Gewinnung von Immuns serum von immunisierten Versuchstieren erzeugt werden.
9. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Flüssigkeit aus Plasma besteht.
10. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Flüssigkeit aus Serum besteht.
11. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Flüssigkeit aus Urin besteht.
12. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Flüssigkeit aus Gewebsextrakten besteht.
13. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Flüssigkeit aus histologischen oder zytologischen Präparaten besteht.

- Leerseite -

BEST AVAILABLE COPY